

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103430841 A

(43) 申请公布日 2013.12.11

(21) 申请号 201310333563.8

(22) 申请日 2013.08.02

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72) 发明人 刘颖 杨跃生 刘振兰 庄楚雄
李静 童欣 惠文凯 陈晓阳

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

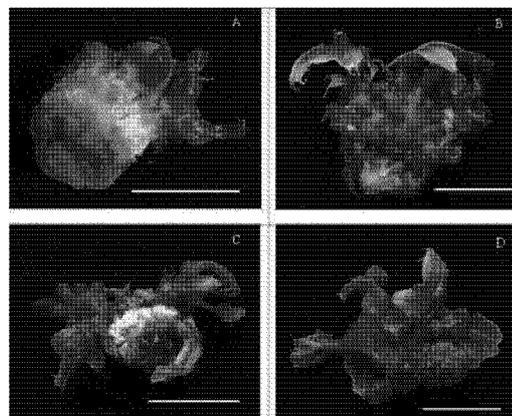
权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法

(57) 摘要

本发明属于植物生物技术领域,具体地,公开了一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法。所述方法改变了传统的麻疯树外植体再生不定芽的方法,即在诱导不定芽再生的培养基中不添加激素,而是利用高浓度的苯基噻二唑基脲溶液对各种来源的麻疯树外植体进行短期浸泡处理,给予外植体细胞短期但高强度的激素刺激,由此促使部分细胞以更高的效率直接再分化形成更多的不定芽。应用本发明所述方法可以显著提高麻疯树外植体不定芽的再生效率和质量。此外,本方法外植体无需经过常规的愈伤组织形成和不定芽增殖阶段,因此可显著缩短再生培养周期,使麻疯树相关生物技术育种的工作效率得到相应的大幅度的提高。



1. 一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - S1. 获得麻疯树外植体;
 - S2. 将步骤 S1 中的麻疯树外植体用 10~60 mg/l 苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 5~40 min;
 - S3. 将步骤 S2 处理后的麻疯树外植体以横放方式接种至无激素的培养基上培养;
所述横放方式为将外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直;
所述麻疯树外植体为成年植株叶片外植体、无菌下胚轴外植体、无菌子叶叶片外植体、无菌子叶叶柄外植体或真叶叶柄外植体。
2. 根据权利要求 1 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,所述无菌下胚轴外植体用 20 mg/l 苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 20 min。
3. 根据权利要求 1 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,所述成年植株叶片外植体或无菌子叶叶片外植体用 20 mg/l 苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 40 min。
4. 根据权利要求 1 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,所述无菌子叶叶柄外植体或真叶叶柄外植体用 20 mg/l 苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 20 min。
5. 根据权利要求 3 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,所述成年植株叶片外植体或无菌子叶叶片外植体在以横放方式接种至无激素的培养基上培养时,采用叶片下表面朝上的接种放置方式。
6. 根据权利要求 1 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于, S3 中所述培养的条件为:光照强度为 2000 ~2500 lx,光照时间为 12~16 小时 / 天,培养温度为 25±1℃。
7. 根据权利要求 1 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于, S3 中所述无激素的培养基以无激素的 MS 培养基为主要成分。
8. 根据权利要求 7 所述一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,所述无激素的培养基还含有 25~35g/l 蔗糖、80~120 mg/l 肌醇和 6~8g/l 琼脂;培养基 pH 为 5.8~6.0。

一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域,具体地,涉及一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法。

背景技术

[0002] 伴随着全球对化石燃料的需求日益增长,存储的化石燃料即将耗尽,人们越来越关注可再生的生物柴油。在可产生生物柴油的候选植物中,属于大戟科的麻疯树(*Jatroha curcas* L.)具有明显的优势,它的种子含油量高,种仁含油量可达40%~60%,同时,麻疯树油中含有活性成分多,如毒蛋白、麻疯酮等有着重要的农药和医药价值。

[0003] 然而,大力推广麻疯树的种植却面临一系列问题,虽然麻疯树种子中含油量高,但种子产量不高;种油中活性成分多,但仍需要改变油的成分才能直接替代化石燃料;麻疯树对环境要求较高,耐寒能力弱,分布区域较窄。麻疯树属包括175个种,可以通过种间杂交引入优良性状,但所需周期长,不能够获得特异的外源基因,故主要通过基因转化改变遗传背景。高频率的植株再生体系是基因转化的基础。

[0004] 麻疯树外植体根据来源不同可以分为不同的类型。从成年麻疯树植株上直接获得叶片、叶柄经处理后可以得到成年植株叶片外植体、成年植株叶柄外植体。将麻疯树种子进行无菌培养得到的无菌苗,从无菌苗上得到无菌下胚轴、无菌子叶叶片和无菌子叶叶柄,经处理后可以得到无菌下胚轴外植体、无菌子叶叶片外植体和无菌子叶叶柄外植体。将麻疯树种子经常规培育、萌发得到的萌发苗,从萌发苗上可以得到下胚轴和真叶叶柄,经处理后可以得到种子苗下胚轴外植体和真叶叶柄外植体。

[0005] 现有技术中诱导麻疯树外植体再生不定芽时,通常是在麻疯树外植体不定芽再生培养基中添加细胞分裂素,而最常用的细胞分裂素为6-苄氨基腺嘌呤(6-BA),浓度为1~2 mg/l;6-糠氨基嘌呤(6-KT),浓度为0.1~1.0 mg/l或苯基噻二唑基脲(TDZ),浓度为0.05~0.5 mg/l。在这种条件下叶柄外植体的不定芽再生效率很低,芽体的质量也较差。同时,这些再生体系均存在周期长(80 d以上)、再生率不高的问题,严重制约了麻疯树遗传转化研究的开展。

发明内容

[0006] 本发明为了克服现有技术麻疯外植体再生不定芽时再生率低、再生芽体质量差、再生周期长的缺陷,提供一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法。所述方法简便,可以显著缩短整个培养周期,而且通过所述的方法可以得到数量更多、质量更好的不定芽。

[0007] 本发明通过以下技术方案予以实现上述目的:

一种促进麻疯树外植体再生不定芽的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. 获得麻疯树外植体;

S2. 将步骤S1中的麻疯树外植体用10~60 mg/l 苯基噻二唑基脲(TDZ)溶液浸泡处理5~40 min;

S3. 将步骤 S2 处理后的麻疯树外植体以横放方式接种至无激素的培养基上培养；
所述横放方式为将外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直；

所述麻疯树外植体为成年植株叶片外植体、无菌下胚轴外植体、无菌子叶叶片外植体、
无菌子叶叶柄外植体、种子苗下胚轴外植体或真叶叶柄外植体。

[0008] 麻疯树外植体根据来源不同可以分为不同的类型。从成年麻疯树植株上直接获得
叶片、叶柄经处理后可以得到成年植株叶片外植体、成年植株叶柄外植体。将麻疯树种子进
行无菌培养得到的无菌苗，从无菌苗上得到无菌下胚轴、无菌子叶叶片和无菌子叶叶柄，经
处理后可以得到无菌下胚轴外植体、无菌子叶叶片外植体和无菌子叶叶柄外植体。将麻疯
树种子经常规培育、萌发得到的萌发苗，从萌发苗上可以得到下胚轴和真叶叶柄，经处理后
可以得到种子苗下胚轴外植体和真叶叶柄外植体。

[0009] 优选地，所述无菌下胚轴外植体用 20 mg/l 苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 20 min。

[0010] 优选地，所述成年植株叶片外植体或无菌子叶叶片外植体用 20 mg/l 苯基噻二唑
基脲溶液浸泡处理 40 min。

[0011] 优选地，所述无菌子叶叶柄外植体或真叶叶柄外植体用 20 mg/l 苯基噻二唑基脲
溶液浸泡处理 20 min。

[0012] 同时，发明人在前期研究工作中发现：从成年麻疯树植株上获得的成年植株叶柄
外植体最适合的处理方式为用 3 mg/l 苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理 5 min，不定芽的再生
效果最好。本发明同时也发现：而种子苗下胚轴外植体不适宜采用苯基噻二唑基脲溶液浸
泡处理的方法来诱导不定芽再生。由此可以看出：不同类型的麻疯树外植体的细胞的分裂
能力各异，不同类型的麻疯树外植体对 TDZ 的敏感性也不同，决定了其再生不定芽的难易
程度不同，所以，不是所有类型的麻疯树外植体都可以采用这种方法来诱导不定芽再生。

[0013] 优选地，所述成年植株叶片外植体或无菌子叶叶片外植体在以横放方式接种至无
激素的培养基上培养时，采用叶片下表面朝上的接种放置方式，其不定芽的再生效果比较
好。所谓叶片下表面朝上的接种放置方式就是说让叶片的上表面紧贴培养基表面，叶片下
表面朝上。

[0014] 步骤 S2 的 TDZ 溶液采用一般方法配制所需即可，具体地，可以采用如下方法配
制：称取一定量的 TDZ 粉末，用 1mol/l NaOH 充分溶解，再用去离子水定容，采用 1 mol/l
HCl 溶液调整 TDZ 处理溶液的 pH 至 5.8~6.0；使用前用 0.22 微米的水系滤膜对已配制好的
TDZ 处理溶液进行过滤灭菌。

[0015] 所述不同类型的麻疯树外植体的制备方法可以参考本技术领域常规方法得到即
可。

[0016] 优选地，步骤 S3 中所述培养的条件为：光照强度为 2000~2500 lx，光照时间为
12~16 小时 / 天，培养温度为 25±1℃。

[0017] 本发明的创造点在于先用高浓度的激素短暂处理，再用无激素的培养基培养再生
不定芽，无激素培养基的种类对本发明来说不是着重点，只要是不含激素，而且能够为不定
芽的再生提供充足营养成分的培养基都可以实现本发明。优选地，本发明步骤 S3 中所述无
激素的培养基以无激素的 MS 培养基为主要成分。另外，所述无激素的培养基还含有 25~35
g/l 蔗糖、80~120 mg/l 肌醇和 6~8 g/l 琼脂；培养基 pH 为 5.8~6.0。所述培养基并不限定
本发明的保护范围。

[0018] 传统麻疯树外植体不定芽再生培养方法之所以存在不定芽再生效率很低,芽体的质量差、周期长的缺陷,首先是因为长时间培养外植体不能够用高浓度的细胞分裂素,因为长期高浓度激素培养外植体将导致外植体受伤甚至死亡,而低浓度的细胞分裂素的刺激不定芽再生的作用又不够强。其次是在不定芽形成以后残存在培养基和外植体组织中的细胞分裂素对不定芽的进一步生长有十分不利的影响。

[0019] 本发明对通常的麻疯树外植体不定芽再生培养方法进行了创新,即在诱导不定芽再生培养基中都不添加 TDZ,取而代之的是利用高浓度的 TDZ 溶液对麻疯树外植体进行短期的浸泡处理,给予外植体具有分化能力的细胞相对于普通添加 TDZ 的培养基更强的刺激,诱导形成更多的不定芽。同时,由于仅是局部短时的浸泡处理,TDZ 在细胞中的浓度随后很快降低,减少了在培养后期对所形成的不定芽的发育的负面影响,可以达到一次培养操作就可以得到完整植株的高效目的。

[0020] 本发明的发明人在前期工作中只研究了高浓度苯基噻二唑基脲短期处理方法促进成年植株叶柄外植体不定芽再生的效果。但是,后来经过大量的创造性试验发现:不同类型的麻疯树外植体的细胞的分裂能力各异,不同类型的麻疯树外植体对 TDZ 的敏感性也不同,决定了其再生不定芽的难易程度不同,所以,不是所有类型的麻疯树外植体都可以采用这种方法来诱导不定芽再生。

[0021] 本发明的有益效果:

本发明所述麻疯树外植体直接再生不定芽的方法简便,可以显著缩短整个培养周期,传统方法的再生周期为 80 天以上,而本方法只需 70 天;通过本发明所述的麻疯树外植体直接再生不定芽的方法可以得到数量更多、质量更好的不定芽,现有方法的不定芽再生率一般为 16.08 %~55.11 %,而采用本发明的方法的不定芽再生率为 75.67 %~92.98 %。

[0022] 说明书附图

图 1. 不同浓度的 TDZ 溶液处理无菌下胚轴外植体 20 分钟后不定芽再生培养 35 天的效果;A:10 mg/l;B:20 mg/l;C:30 mg/l;D:60 mg/l;bar =1 cm。

[0023] 图 2. 无菌下胚轴外植体再生不定芽在伸长培养基上培养 15 天后的效果;A:再生不定芽在伸长培养基中的生长效果图;B:将再生不定芽从伸长培养基中取出来的效果图;bar =1 cm。

[0024] 图 3. 采用 20 mg/l TDZ 溶液浸泡处理 2 种类型下胚轴外植体 20 min 后以两种方式接种至不定芽再生培养基上培养 35 天后的效果;A:无菌下胚轴外植体横放方式;B:无菌下胚轴外植体竖插方式;C:种子苗下胚轴外植体横放方式;D:种子苗下胚轴外植体竖插方式;bar =1 cm。

[0025] 图 4. 采用 20 mg/l 的 TDZ 溶液浸泡处理 2 种类型叶柄外植体 20 min 后以两种方式接种至不定芽再生培养基上培养 35 天后的效果;A:真叶叶柄外植体横放方式;B:真叶叶柄外植体竖插方式;C:无菌子叶叶柄外植体横放方式;D:无菌子叶叶柄外植体竖插方式;bar =1 cm。

[0026] 图 5. 2 种类型叶柄外植体再生不定芽在伸长培养基上培养 15 天后的效果;A、B:真叶叶柄外植体再生不定芽伸长效果;C、D:无菌子叶叶柄外植体再生不定芽伸长效果;bar =1 cm。

[0027] 图 6. 采用 20 mg/l TDZ 溶液浸泡处理 2 种类型叶片外植体 40 min 后以两种方式

接种至不定芽再生培养基上培养 35 天后的效果 ;A :成年植株叶片外植体上表面朝上,B :成年植株叶片外植体下表面朝上 ;C :无菌子叶叶片外植体上表面朝上 ;D :无菌子叶叶片外植体下表面朝上 ;bar =1 cm。

[0028] 图 7. 无菌子叶叶片外植体再生不定芽在伸长培养基上培养 15 天后的效果图 ;bar =1 cm。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。除非特别说明,实施例中采用的试剂和方法为本领域常规使用的试剂和方法。

[0030] 实施例 1 :

S1. 对外植体进行短期细胞分裂素溶液处理的容器的准备

选取直径为 9 cm 的有盖培养皿,置于高压蒸汽灭菌锅中,在 121℃,0.1 MPa 的条件下灭菌 20 min。

[0031] S2. 苯基噻二唑基脲(TDZ)处理溶液的配制。

[0032] 准确称取一定量的 TDZ 粉末,用 1 mol/l NaOH 溶液充分溶解,再用去离子水定容,配制成 0、10、20、30、40、50、60 mg/l 的 TDZ 处理溶液(对照组 0 mg/l TDZ 溶液为无菌去离子水)。采用 1 mol/l HCl 溶液调整 TDZ 处理溶液的 pH 至 5.8~6.0 ;使用前用 0.22 微米的水系滤膜对已配制好的 TDZ 处理溶液进行过滤灭菌。

[0033] S3. 麻疯树无菌下胚轴外植体的获取

将浸泡了 2 天的麻疯树种子去壳,经过 0.1% 升汞溶液灭菌后,在超净工作台中用无菌手术刀剥离胚胎,将剥离的胚胎接种至经过高温蒸汽灭菌的 MS 培养基(MS 配方成分+30 g/l 蔗糖+100 mg/l 肌醇+6 g/l 琼脂;pH5.8-6.0)上,培养 12 天后,获取种子苗上的下胚轴,用无菌手术刀将下胚轴切成长度约为 0.5 cm 的下胚轴切段,即可作为无菌下胚轴外植体。

[0034] S4. 细胞分裂素(TDZ)溶液处理麻疯树种子苗下胚轴外植体

在超净工作台中,把切好的无菌下胚轴外植体分别置于上述步骤 S1 准备好的灭过菌的培养皿中,向各个培养皿中分别倒入上述步骤 S2 配置的各个浓度的 TDZ 处理溶液至浸没叶柄外植体为止,盖上培养皿盖,静置 20 min 后,倒掉 TDZ 溶液,保留无菌下胚轴,用灭过菌的镊子从培养皿中取出所有的无菌下胚轴外植体,放置在无菌吸水纸上,吸去无菌下胚轴外植体表面多余的水分,每个浓度的 TDZ 溶液分别有 3 个平行处理。

[0035] S5. 将切好的无菌下胚轴外植体置于细胞分裂素(TDZ)溶液处理的容器中,向该容器的广口玻璃瓶中倒入不同浓度的 TDZ 溶液(0、10、20、30、60 mg/l)至浸没所有的无菌下胚轴外植体为止(对照组 0 mg/l TDZ 溶液为无菌去离子水),盖上瓶盖,静置 20 min 后,倒掉 TDZ 溶液,保留下胚轴,用灭过菌的镊子从广口玻璃瓶中取出所有的无菌下胚轴外植体,放置在无菌吸水纸上,吸去下胚轴外植体表面多余的液体,最后把处理后的无菌下胚轴外植体以横放方式(将下胚轴外植体放置在培养基上,使下胚轴外植体与培养基表面轻轻接触,并且使下胚轴外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直)接种在无激素 MS 培养基(MS 配方成分+30 g/l 蔗糖+100 mg/l 肌醇+6 g/l 琼脂;pH5.8~6.0)上培养 35 天,所获得实验结果如表 1 和图 1 所示。

表 1 不同浓度的 TDZ 溶液浸泡处理麻疯树无菌下胚轴外植体诱导不定芽直接再生的效果

TDZ 浓度 (mg/l)	再生率 (%)	平均每个外植体上的芽数 (颗)
0	0d	0e
10	52.45 ± 4.24c	4.19 ± 0.62d
20	81.91 ± 2.65a	10.16 ± 0.81a
30	64.44 ± 3.85b	7.48 ± 0.34b
60	52.96 ± 3.14c	5.33 ± 0.30c

注:数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ($P \leq 0.05$), 数据后字母不同表示处理间差异显著。再生率 (%) = (再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数) × 100%; 平均每个外植体的芽数 (颗) = 再生不定芽总数 / 再生出不定芽的外植体数。

[0036] 从表 1 中可知, 未用 TDZ 溶液处理的无菌下胚轴外植体没有不定芽产生, 而用不同浓度 TDZ 溶液处理的无菌下胚轴外植体均能再生出不定芽, 但不同浓度 TDZ 溶液处理诱导无菌下胚轴外植体再生不定芽的频率和每个外植体的平均再生芽数多表现显著差异。此外, 随着 TDZ 浓度的增加, 不定芽再生率和平均每个无菌下胚轴外植体的再生芽数表现出先增加后降低的趋势; 其中 TDZ 溶液浓度为 20 mg/l 时, 不定芽的再生率和平均每个外植体的芽数均为最高, 分别为 81.91% 和 10.16 颗。

[0037] 同时, 采用传统方法诱导麻疯树无菌下胚轴外植体不定芽再生: 把切好的下胚轴外植体直接以横放方式 (将下胚轴外植体放置在培养基上, 使下胚轴外植体与培养基表面轻轻接触, 并且使下胚轴外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直) 接种于添加了不同浓度 TDZ (0、0.1、0.3、0.6、1.2 mg/l) 的 MS 培养基上培养 35 天 (对照组 0 mg/l TDZ 溶液为无菌去离子水), 所获得实验结果如表 2 所示。

[0038] 表 2 采用传统方法诱导麻疯树无菌下胚轴外植体不定芽再生

TDZ 浓度 (mg/l)	再生率 (%)	平均每个外植体上的芽数 (颗)
0	0d	0d
0.1	9.93 ± 1.81c	1.19 ± 0.12c
0.3	18.80 ± 1.93b	1.81 ± 0.32b
0.6	22.73 ± 4.06b	2.13 ± 0.24b
1.2	30.97 ± 2.38a	3.03 ± 0.32a

注:数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ($P \leq 0.05$), 数据后字母不同表示处理间差异显著。再生率 (%) = (再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数) × 100%; 平均每个外植体的芽数 (颗) = 再生不定芽总数 / 再生出不定芽的外植体数。

[0039] 从表 2 可知, 当添加的 TDZ 浓度为 1.2 mg/l 时, 不定芽再生率和平均每个外植体的芽数均为最高, 分别为 30.97% 和 3.03 颗。

[0040] 综上所述, 由两个表中的数据可知, 采用短期高浓度 TDZ 浸泡处理麻疯树无菌下胚轴外植体的不定芽再生效果显著优于采用传统方法的效果。

[0041] 按照实施例所述高浓度 TDZ 处理得到的无菌下胚轴外植体再生不定芽在不定芽伸长培养基 (MS 配方成分 +30 g/l 蔗糖 +100 mg/l 肌醇 +0.5 mg/l BA(苄氨基腺嘌呤)+0.2 mg/l KT (激动素)+0.4 mg/l GA3 (赤霉素)+0.2 mg/l IAA (吲哚乙酸)+10 mg/l 精氨酸 +5 g/l 琼脂; pH5.8~6.0) 上培养 15 天后, 可获得较多生长状态良好的再生不定芽芽条, 结果见图 2。

[0042] 实施例 2 TDZ 溶液浸泡处理麻疯树无菌下胚轴外植体的时间对直接再生不定芽效果的影响

S1. 对外植体进行短期细胞分裂素溶液处理的容器的准备: 同实施例 1。

[0043] S2. 配置 20 mg/l 的苯基噻二唑基脲 (TDZ) 溶液: 同实施例 1。

[0044] S3. 麻疯树无菌下胚轴外植体的获取: 同实施例 1

S4. 细胞分裂素 (TDZ) 溶液处理麻疯树无菌下胚轴外植体: 将切好的无菌下胚轴外植体置于细胞分裂素 (TDZ) 溶液处理的容器中, 向该容器的广口玻璃瓶中倒入浓度为 20 mg/l 的 TDZ 溶液至浸没所有的下胚轴外植体为止 (对照组 0 mg/l TDZ 溶液为无菌去离子水), 盖上瓶盖, 对下胚轴外植体进行不同时间 (0、5、20、40 min) 的 TDZ 溶液浸泡处理后, 倒掉 TDZ 溶液, 保留下胚轴外植体, 用灭过菌的镊子从广口玻璃瓶中取出所有的下胚轴外植体, 放置在无菌吸水纸上, 吸去下胚轴外植体表面多余的液体, 最后把处理后的下胚轴外植体以横放方式 (将下胚轴外植体放置在培养基上, 使下胚轴外植体与培养基表面轻轻接触, 并且使下胚轴外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直) 接种在无激素 MS 培养基 (MS 配方成分 +30 g/l 蔗糖 +100 mg/l 肌醇 +6 g/l 琼脂; pH5.8~6.0) 上培养 35 天, 所获得实验结果如表 3 所示。

[0045] 表 3 TDZ 溶液浸泡处理时间对麻疯树无菌下胚轴外植体直接再生不定芽的影响

处理时间 (min)	再生率 (%)	平均每个外植体上的芽数 (颗)
0	0d	0d
5	53.61 ± 3.37c	5.46 ± 0.52c
20	81.91 ± 2.65a	10.16 ± 0.81a
40	61.51 ± 4.81b	6.99 ± 0.32b

注:数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ($P \leq 0.05$), 数据后字母不同表示处理间差异显著。再生率 (%) = (再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数) × 100%; 平均每个外植体的芽数 (颗) = 再生不定芽总数 / 再生出不定芽的外植体数。

[0046] 从表 3 中可知, 随着浸泡处理无菌下胚轴外植体的时间增加, 不定芽再生率和平均每个外植体的再生芽数表现出先增加后降低的趋势, 以浸泡时间为 20 min 时的不定芽再生效果最佳。

[0047] 实施例 3

S1. 对外植体进行短期细胞分裂素溶液处理的容器的准备: 同实施例 1。

[0048] S2. 配置 20 mg/l 的苯基噻二唑基脲 (TDZ) 溶液, 具体配置方法同实施例 1。

[0049] S3. 麻疯树无菌下胚轴外植体和种子苗下胚轴外植体的获取: 具体方法同实施例 1。

[0050] S4. 细胞分裂素 (TDZ) 溶液分别处理麻疯树无菌下胚轴外植体和种子苗下胚轴外植体: 将切好的 2 种类型的下胚轴外植体置于细胞分裂素 (TDZ) 溶液处理的容器中, 向该容器的广口玻璃瓶中倒入浓度为 20 mg/l 的 TDZ 溶液至浸没所有的下胚轴外植体为止, 盖上瓶盖, 对下胚轴外植体进行 20 min 的浸泡处理后, 倒掉 TDZ 溶液, 保留下胚轴外植体, 用灭过菌的镊子从广口玻璃瓶中取出所有的下胚轴外植体, 放置在无菌吸水纸上, 吸去下胚轴外植体表面多余的液体, 最后把处理后的下胚轴外植体以两种放置方式 (横放方式: 将下胚轴外植体放置在培养基上, 使下胚轴外植体与培养基表面轻轻接触, 并且使下胚轴外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直。竖插方式: 将下胚轴外植体放置在培养基上, 使得下胚轴外植体的中轴与培养基表面相垂直, 下胚轴外植体插入培养基中的深度为 0.1~0.2 cm。) 接种在无激素 MS 培养基 (MS 配方成分 +30 g/l 蔗糖 +100 mg/l 肌醇 +6 g/l 琼脂; pH5.8~6.0) 上培养 35 天, 所得实验结果如表 4 所示。

[0051] 表 4 下胚轴外植体接种放置方式对不定芽再生效果的影响

外植体来源	放置方式	再生率 (%)	平均每个外植体上的芽数 (颗)
1	横放	81.91 ± 2.65a	10.16 ± 0.81a
1	竖插	38.51 ± 3.40b	4.27 ± 0.45b
2	横放	25.70 ± 2.59a	2.04 ± 0.25a
2	竖插	11.03 ± 1.81b	1.17 ± 0.11b

注:数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较($P \leq 0.05$),数据后字母不同表示处理间差异显著。再生率(%) = (再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数) \times 100%; 平均每个外植体的芽数(颗) = 再生不定芽总数 / 再生出不定芽的外植体数。外植体来源 1 为来源于麻疯树去壳种子的胚胎在无菌的 MS 培养基上培养 12 天后获取的无菌下胚轴外植体;外植体来源 2 为来源于疯树种子在培养基质(土:沙砾=1:1)上以自然条件培养 12 天后获取的种子苗下胚轴外植体。

[0052] 从表 4 中的数据可知,无论是哪种来源的下胚轴外植体,采用横放方式接种的外植体不定芽再生效果均显著优于竖插方式的再生效果。而种子苗下胚轴外植体不定芽再生率仅为 25.70%,因此不适宜采用苯基噻二唑基脲溶液浸泡处理的方法来诱导种子苗下胚轴外植不定芽再生。

[0053] 实施例 4

分别参考实施例 1、2 和 3 的步骤,研究不同浓度 TDZ 溶液处理成年植株叶片外植体、无菌子叶叶片外植体、种子苗下胚轴外植体、无菌子叶叶柄外植体和真叶叶柄外植体的不定芽再生的情况。

[0054] 由结果得知:成年植株叶片外植体、无菌子叶叶片外植体最适合的 TDZ 溶液的浓度为 20 mg/l,处理时间为 40 min;无菌子叶叶柄外植体和真叶叶柄外植体最适合的 TDZ 溶液的浓度为 20 mg/l,处理时间为 20 min。而种子苗下胚轴外植体不适宜采用高浓度 TDZ 溶液短期浸泡处理的方法来诱导不定芽再生。

[0055] 实施例 5:不同接种方式对麻疯树两种类型叶柄外植体再生不定芽效率的影响

本实施例所述的两种类型叶柄外植体分别为无菌子叶叶柄外植体和真叶叶柄外植体。无菌子叶叶柄外植体来源于自然萌发种子苗真叶叶柄;真叶叶柄外植体来源于无菌萌发种子苗子叶叶柄。

[0056] 将切好的 2 种类型的叶柄外植体置于细胞分裂素(TDZ)溶液处理的容器中,向该容器的广口玻璃瓶中倒入浓度为 20 mg/l 的 TDZ 溶液至浸没所有的叶柄外植体为止,盖上瓶盖,对叶柄外植体进行 20 分钟的浸泡处理后,倒掉 TDZ 溶液,保留叶柄外植体,用灭过菌的镊子从广口玻璃瓶中取出所有的叶柄外植体,放置在无菌吸水纸上,吸去叶柄外植体表面多余的液体,最后把处理后的叶柄外植体以两种放置方式(横放方式:将叶柄外植体放置在培养基上,使叶柄外植体与培养基表面轻轻接触,并且使叶柄外植体的横切面与培养基的水平表面相垂直。竖插方式:将叶柄外植体放置在培养基上,使得叶柄外植体的中轴与培养基表面相垂直,叶柄外植体的形态学下端插入培养基中的深度为 0.1~0.2 cm。)接种在无激素 MS 培养基(MS 配方成分 +30 g/l 蔗糖 +100 mg/l 肌醇 +6 g/l 琼脂;pH5.8~6.0)上培养 35 天,所得实验结果如表 5 和图 4 所示。

[0057] 表 5 叶柄外植体接种放置方式对不定芽再生效果的影响

外植体类型	外植体放置方式	再生率 (%)	平均每个外植体上的芽数
真叶叶柄	横放	92.98 ± 6.08a	13.83 ± 0.51a
真叶叶柄	竖插	47.14 ± 2.58b	5.36 ± 0.12b
无菌子叶叶柄	横放	88.42 ± 3.67a	12.67 ± 0.42a
无菌子叶叶柄	竖插	50.92 ± 4.54b	6.45 ± 0.48b

注:数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ($P \leq 0.05$), 数据后字母不同表示处理间差异显著。再生率 (%) = (再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数) × 100%; 平均每个外植体的芽数 (颗) = 再生不定芽总数 / 再生出不定芽的外植体数。

[0058] 从表 5 中的数据可知, 无论是哪种类型的叶柄外植体, 采用横放接种方式的不定芽再生效果均显著优于竖插方式的效果。

[0059] 2 种类型的叶柄外植体再生不定芽在不定芽伸长培养基 (MS 配方成分 +30 g/l 蔗糖 +100 mg/l 肌醇 +0.5 mg/l BA (苄氨基腺嘌呤) +0.2 mg/l KT (激动素) +0.4 mg/l GA3 (赤霉素) +0.2 mg/l IAA (吲哚乙酸) +10 mg/l 精氨酸 +5 g/l 琼脂; pH5.8~6.0) 上培养 15 天后, 可获得较多生长状态良好的再生不定芽芽条, 结果见图 5。

[0060] 实施例 6: 不同接种方式对 2 种类型麻疯树叶片外植体再生不定芽效率的影响

本次实验, 选用如说明书 c 中所述经表面灭菌后成年树龄的麻疯树茎顶端叶片和无菌条件下培养 12 天的种子苗上的子叶叶片为实验材料, 在超净工作台中用无菌手术刀将叶片切成大小约为 0.5 × 0.5 cm 的叶片小块作为外植体, 将切好的叶片外植体置于细胞分裂素溶液处理的容器中, 向该容器的广口玻璃瓶中倒入浓度为 20 mg/l 的 TDZ 溶液至浸没所有的叶片外植体为止, 盖上瓶盖, 对叶片外植体进行 40 min 的 TDZ 溶液浸泡处理后, 倒掉 TDZ 溶液, 保留叶片, 用灭过菌的镊子从广口玻璃瓶中取出所有的叶片外植体, 放置在无菌吸水纸上, 吸去叶片外植体表面多余的液体, 最后把处理后的叶片外植体以两种放置方式接种 (使得叶片外植体的下表面朝上, 其上表面与培养基表面接触; 使得叶片外植体的上表面朝上, 其下表面与培养基表面接触) 在无激素 MS 培养基上培养 35 天, 所获得实验结果如表 6 和图 6 所示。

[0061] 表 6 叶片外植体的接种方式对不定芽再生效果的影响

外植体类型	接种放置方式	再生率 (%)	平均每个外植体上的芽数 (颗)
成年植株叶片	上表面朝上	60.10 ± 2.66b	4.31 ± 0.27b
成年植株叶片	下表面朝上	75.67 ± 4.04a	5.37 ± 0.75a
无菌苗子叶叶片	上表面朝上	64.31 ± 1.57b	8.52 ± 0.25b
无菌苗子叶叶片	下表面朝上	86.44 ± 4.82a	11.22 ± 0.51a

注:数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行方差分析和邓肯多重比较 ($P \leq 0.05$), 数据后字母不同表示差异显著。

[0062] 再生率(%) = (再生出不定芽的外植体数 / 总外植体数) × 100%; 平均芽数(颗) = 再生不定芽总数 / 出芽的总外植体数。

[0063] 从表 6 的数据可知, 对麻疯树叶片外植体进行再生不定芽培养时, 采用叶片下表面朝上的接种放置方式的再生不定芽的效果明显优于采用上表面朝上的接种放置方式的效果。

[0064] 叶片外植体再生不定芽在不定芽伸长培养基(MS 配方成分 +30 g/l 蔗糖 +100 mg/l 肌醇 +0.5 mg/l BA (苄氨基腺嘌呤) +0.2 mg/l KT (激动素) +0.4 mg/l GA3 (赤霉素) +0.2 mg/l IAA (吲哚乙酸) +10 mg/l 精氨酸 +5 g/l 琼脂 ;pH5.8~6.0) 上培养 15 天后, 可获得较多生长状态良好的再生不定芽芽条。无菌苗子叶叶片在不定芽伸长培养基培养 15 天后的结果见图 7。

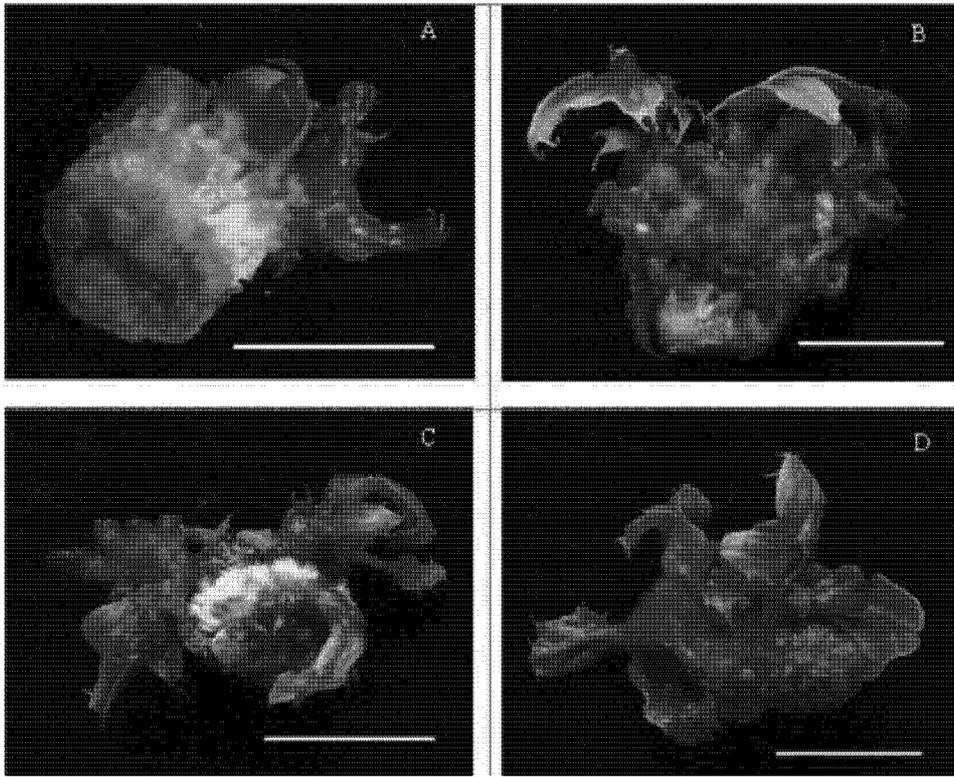


图 1

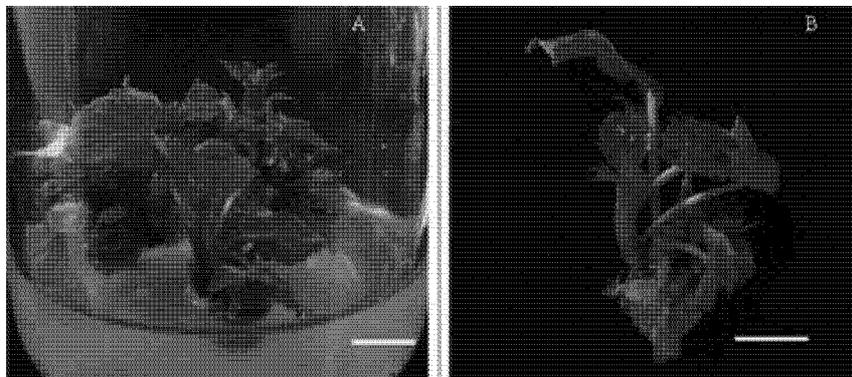


图 2

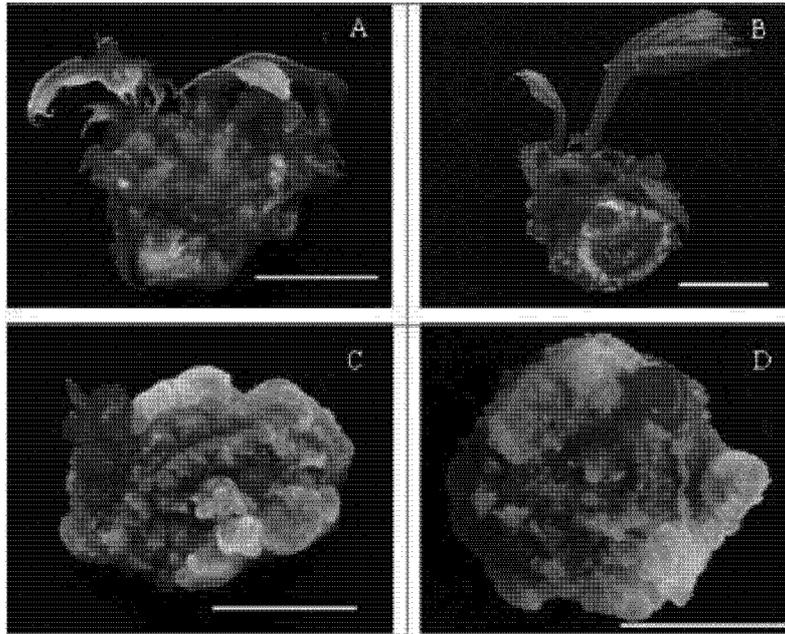


图 3

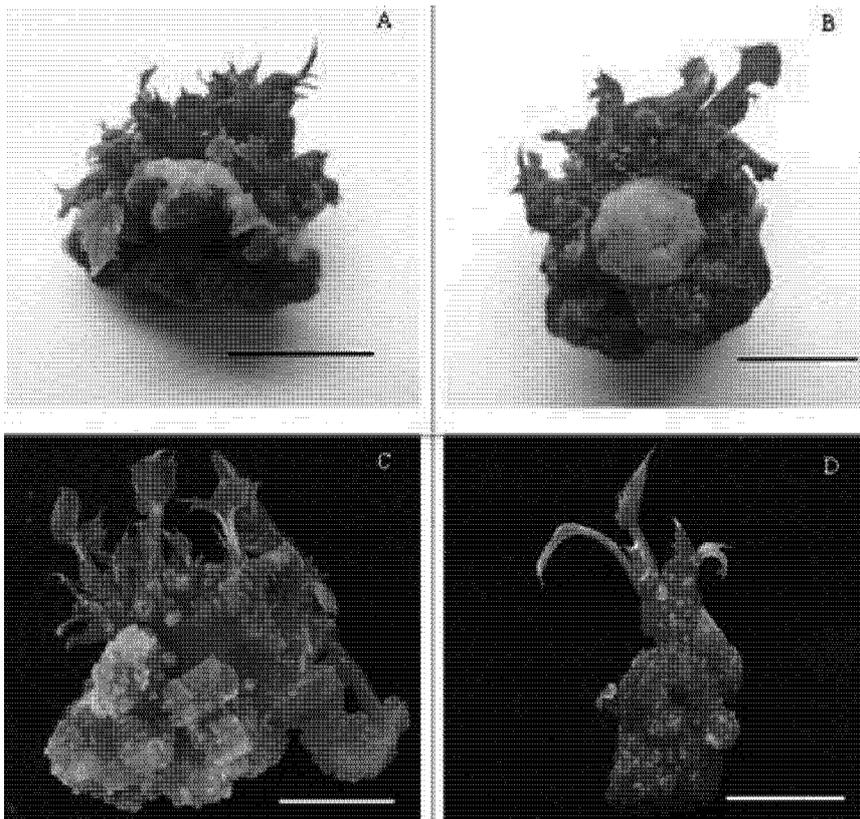


图 4

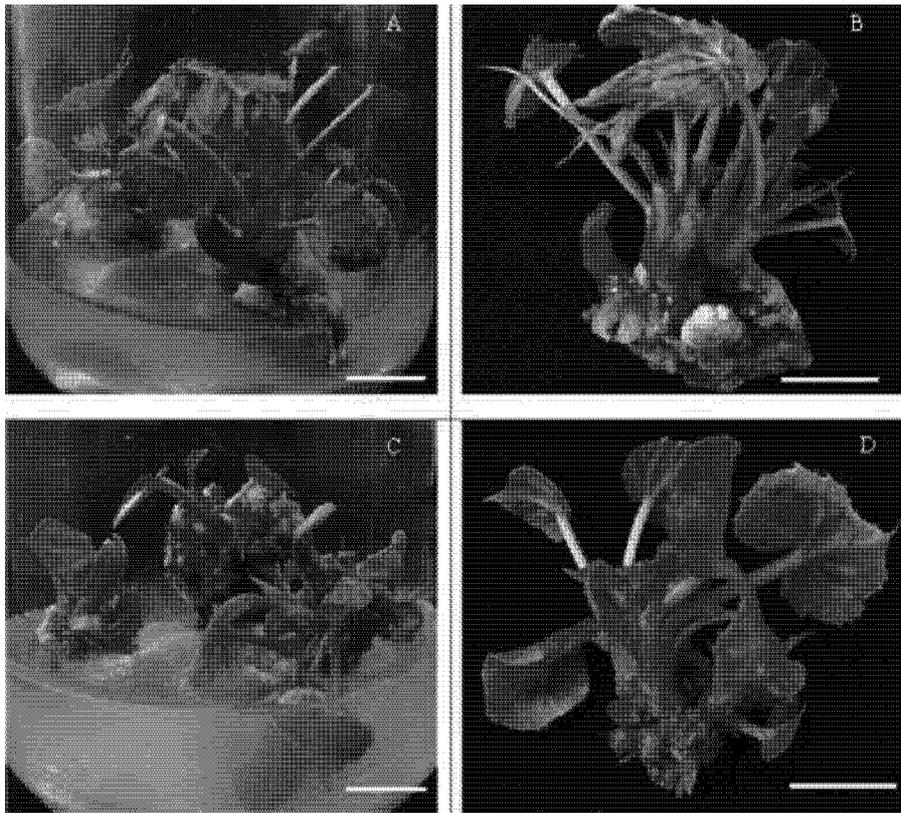


图 5

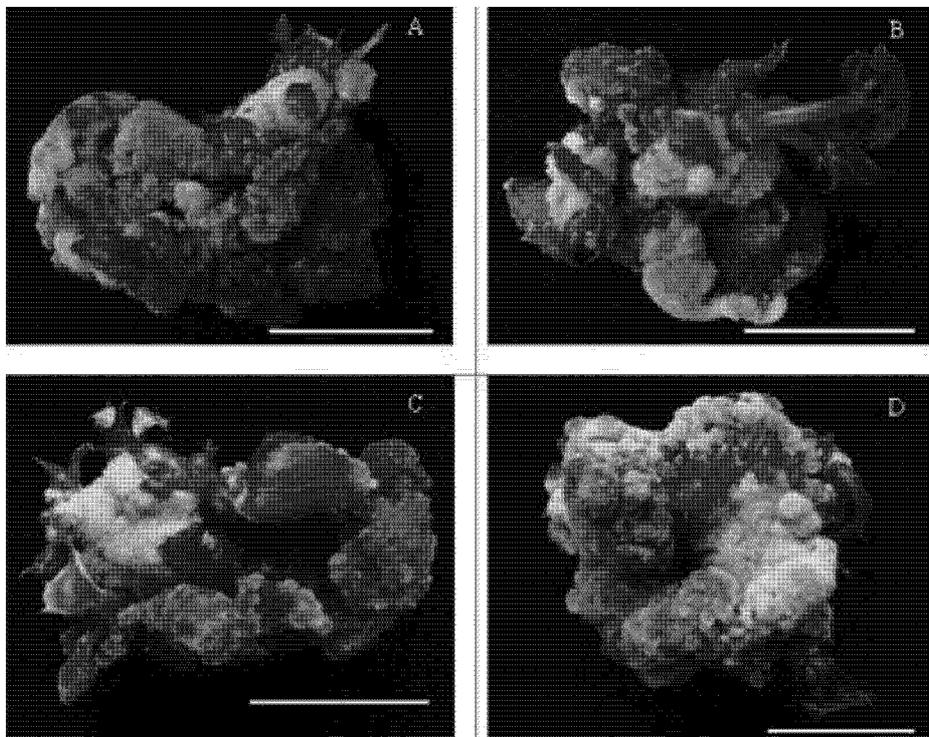


图 6

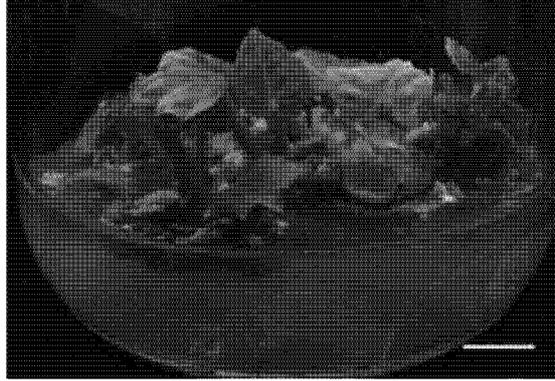


图 7